Prof. Dott. B. GOSIO

Vaccini anticolerico ed antitifico, con particolare riguardo alla loro preparazione in grande.

Estratto dal Bollettino della R. Accademia Medica di Roma
Anno XLII — Fascicolo III-IV

ROMA
Tipografia F. Centenari
1916

PROF. DOTT. B. GOSIO

Vaccini anticolerico ed antitifico, con particolare riguardo alla loro preparazione in grande.

Estratto dal Bollettino della R. Accademia Medica di Roma
Anno XLII — Fascicolo III-IV

ROMA
TIPOGRAFIA F. CENTENARI
1916

Le vaccinazioni anticoleriche ed antitifiche — in genere le vaccinazioni antibatteriche — si sono ormai imposte là dove «gruppi disciplinabili d'individui» debbono affrontare speciali pericoli di contagio, pericoli la cui gravità non può soltanto dedursi dalla facile propagazione degli elementi morbigeni per gli estesi e subdoli contatti, ma anche, e sopratutto, da quelle circostanze aggravanti, che, sensibilizzando gli organismi, ne creano le vere e proprie candidature infettive. Un caso classico è dato dagli eserciti in campagna; essi, oltre alle molteplici incognite inerenti alle riforniture dei cibi e delle bevande, sono esposti a continui strapazzi di corpo e di spirito, che vulnerano fortemente la resistenza individuale. Molto importante è dunque il disporre, in simili casi, di un mezzo, che, insieme a tante altre misure suggerite dall'igiene, contribuisca a far traboccare la bilancia a favore dell'organismo fin dal primo momento in cui questo si trovasse alle prese con un'incipienza infettiva, che minaccia d'invaderlo.

Di siffatte applicazioni profilattiche, a cui più che in ogni altro caso spetta il qualificativo di «specifiche» l'attuale guerra offre tuttodì un grandioso esempio: milioni e milioni di combattenti vengono, ad intervalli, vaccinati e rivaccinati e, dove la pratica fu ben condotta, ha reso indiscutibili servigi.

Orbene, fra le condizioni del successo, in prima linea, è da annoverarsi quella relativa alla qualità dei vaccini che si impiegano, epperciò ai metodi seguìti per assicurarne la genuinità e l'efficacia.

I vaccini batterici sono facili a deteriorarsi, ove non sostino a basse temperature ed al riparo della luce; ma anche protetti in tal senso e fatti segno alle più congrue cautele, dopo qualche tempo cominciano a perdere del loro valore specifico, tanto più che diffuso è il sistema di conservarli uniti ad antisettici. Sicchè l'unica vera garanzia riposa sulla norma di escludere dall'uso i vaccini vecchi, disponendo sempre di materiali freschi e ben titolati, pronti per ogni richiesta.

Chiunque però consideri le vicende della pratica, in questa materia, deve convincersi delle specialissime esigenze che si presentano: esigenze subitanee, esigenze di *grande stile* ed anche da un giorno all'altro mutevoli. Perciò, nella preparazione di questi vaccini, si è forzatamente tenuti a *far presto*, *bene* e *molto*: far presto perchè i pericoli epidemici si affacciano improvvisi: far bene per assicurare non solo il *ne noceat*, ma anche la bontà della materia prima, da cui si ripete la garanzia; far molto, perchè, nel caso della truppa, i vaccinandi sono costituiti da immensi reparti, oltre di che deve tenersi conto del bisogno di ripetere varie volte gli innesti, se si vuol raggiungere un discreto stato immune.

Il nostro laboratorio che, nella preparazione dei vaccini batterici a vantaggio dell'Esercito e della Marina, giusta quanto stabiliva il Direttore generale della Sanità del Regno, ha dovuto e deve contribuire in misura notevolissima, conta ormai al riguardo su un servizio che impegna tutta l'attività del personale. Senza dubbio, per parlare di un organismo irreprensibile, occorre attendere il promesso *Vaccinogeno di Stato*, mentre all'odierno, sia pur congruo assetto d'un laboratorio di vigilanza igienica, per farlo corrispondere alla bisogna, non può concedersi che il titolo di *ripiego*. Comunque sia, almeno dal punto di vista dell'indirizzo tecnico, riteniamo aver raggiunto un grado pregevole di perfezionamento, corrispondendo bene alle varie esigenze del caso.

Ed in questo tempo, in cui gli sforzi devono raddoppiarsi per assicurare, ai combattenti, vaccini abbondanti e sicuri, tornerà a proposito il redigere una memoria descrittiva sui metodi da noi seguìti per ottenerli.

La letteratura sulla tecnica dei vaccini batterici si è smisuratamente arricchita, infiniti essendo gli autori che hanno legato il loro nome ad una qualche modifica; e d'altra parte non può negarsi che il segreto d'un maggiore successo possa il più delle volte risiedere nella *cura del dettaglio*. Se però si va ai concetti sostanziali, si trova che i vaccini oggidì accolti nella pratica appartengono ad una di queste tre categorie: *Emulsioni batteriche vive o morte; estratti a solvente fisico* (*autolisati*) ed *estratti a solvente chimico* (*nucleo-proteidi*).

Oggi non possediamo criteri sicuri per decidere quale vaccino debba preferirsi in ordine alla maggior garanzia protettiva conciliata colla tolleranza dell'individuo. Quando questo punto non fosse più controverso ed un determinato vaccino decisamente s'imponesse su tutti gli altri, bisognerebbe impostare la tecnica di laboratorio in misura da realizzarne la provvista necessaria. Nell'attesa di tale designazione, il compito del batteriologo si riduce a fornire quel vaccino, che, per comune consenso illuminato da ampio battesimo, essendo stato riconosciuto vantaggioso, si presta poi alla conciliazione dei vari interessi pratici sovraesposti, con speciale riguardo alla rapidità della preparazione ed alla costanza del tipo.

Questo vaccino è quello che si ottiene a mezzo delle colture in agar. Ed il nostro laboratorio, che in un primo tempo dovette, per necessità di cose, produrre molti vaccini in brodo, non appena potè affrontare il problema, in grazia d'una vetreria idonea e d'una razionale preparazione, subito desistette dall'impiego di mezzi culturali liquidi, per attenersi agli insemenzamenti su larghe piastre d'agar, più fisse nella loro composizione, più facili a garantirsi dalle cause inquinanti, più pronte a riconoscersi quando sono inquinate ed infine più redditizie.

Passerò in rivista — dove occorre fino ai dettagli — l'indirizzo tecnico seguìto, non trascurando i ripieghi, a cui in vari casi dovemmo ricorrere per riparare al mancato aiuto di molta industria straniera, a cui s'era fatta un'abitudine eccessiva e, diciamo pure, condannevole.

Il concetto generale che presiede alle preparazioni, onde

qui c'interessiamo, deve naturalmente esser quello che mira alla purezza delle masse batteriche dirette a costituire il vaccino; e ciò non solo per assicurargli l'intiero potere specifico desiderato, ma bensì anche per garantirlo da una nocività in causa di germi estranei che avessero ad inquinarlo. Molte suppurazioni, forme erisipelatose e vari casi di tetano, di cui s'incolparono taluni materiali d'innesto ipodermico, hanno appunto origine dal non averli abbastanza salvaguardati dal pulviscolo atmosferico. La garanzia al riguardo si accresce di molto quando si lavori al coperto e si semplifichi la tecnica, risparmiandole talune manipolazioni, che, per quanto scrupolo si usi, sempre hanno un margine di errore temibile.

Ed anzitutto si vede la necessità di un adatto corredo, che restringa, per così dire, le superficie vulnerabili ed il numero degli atti precauzionali purtroppo sempre soltanto relativi.

Il punto di maggiore importanza si riferisce all'ambiente di coltura. L'uso delle ordinarie capsule Petri, quando si tratti di produrre su larga scala, si rivela poco idoneo all'asepsi rigorosa, attese le ampie breccie esposte all'aria non filtrata e le non tanto semplici manualità che si esigono all'atto della raccolta. Maggior garanzia si ottiene colle bottiglie di Kolle: esse però, come tutte le fiasche analoghe, lasciano sempre a desiderare per l'unicità ed ampiezza dell'imboccatura, oltre al tempo considerevole che importa il loro maneggio, al bisogno di servirsi d'imbuti nei travasamenti, ecc.

Dopo avere, con non completa soddisfazione, fatto ricorso ai vari e già noti mezzi di laboratorio, mi sono deciso a far costrurre una capsula coperta, munita delle vie e dei congegni necessari ad un pronto recupero del materiale con notevolissima garanzia contro ogni causa inquinante. Questa capsula si distingue dalle ordinarie boccie Fernbach, già in uso sovratutto per i terreni liquidi, e le supera poi di molto nella corrispondenza al nostro scopo, in grazia di talune particolarità. Essa è più stretta, ha tre vie comunicanti coll'esterno, ed ha il fondo contornato da un leggero solco. Questo solco ivi assicura un maggior accumulo di terreno nutritivo, sicchè quando l'agar vi si solidifica, viene a costituirsi una specie di cravatta, che,

nelle varie manovre, impedisce o, almeno, rende assai più difficile il distacco dello strato, evitando così le anfrattuosità, i grumi, i detriti vari, che disturbano non poco la raccolta e la rendono imperfetta.

La figura 1 riportata nelle tavole illustrative riproduce il tipo di bottiglia in uso presso il nostro laboratorio. Ogni bottiglia riceve circa 150 cmc. di agar; quindi si munisce di congrui tappi d'ovatta ed accresciute ancora le garanzie con custodie di vetro o con involti di carta oppure, occorrendo, con ripieghi intesi a restringere le bocche praticabili, come indica in dettaglio la fig. 2, si provvede alla sterilizzazione in autoclave.

La semina si fa introducendo pel collo della boccia, a mezzo di pipetta Chamberland o di un palloncino con tubo di travasamento funzionante a pressione d'aria filtrata — vedi Fig. 3 — 10-15 goccie d'emulsione batterica sottoposta a rigoroso controllo di purezza. Con opportune manovre di dislivello, si ottiene che il liquido bacillifero mescolato con l'acqua di condensazione, irrori tutta la superficie coltivabile. Un ampio termostato ben regolato riceve grande numero di simili colture, che, a mezzo di livellatori, devono tutte mantenersi ben piane per ottenere uno sviluppo omogeneo su tutta la faccia libera dell'agar.

Dopo circa 24 ore — pel vibrione colerico bastano anche 16-18 — una densa patina cremosa si è costituita dovunque e non deve tardarsi a raccoglierla se vogliono evitarsi fenomeni d'invecchiamento che danneggerebbero il materiale.

Per il distacco della patina serve un sottile e forte getto di soluto fisiologico sterile. Il getto che è derivabile da un pallone a robuste pareti, dove, con garanzia filtrante, l'aria è compressa a mezzo di una pera di gomma, si dirige tangenziale ed in vario senso sulla superficie coltivata, per l'apertura *B* (fig. 1) inclinando opportunamente la boccia.

E' bene contenersi in limiti ristretti nell'aggiunta del liquido, per non troppo diluire; risulteranno in seguito i motivi.

Se, per l'uccisione dei germi, si fa soltanto assegnamento sul potere battericida dell'acido fenico, un sistema oggi molto

usato e da noi pure seguìto, si può fenicare al tasso opportuno (0,5 %) il liquido fisiologico irroratore, avendo poi l'avvertenza di mantenere le raccolte ad una temperatura appena adatta per assicurare l'efficacia dell'antisettico.

Se invece si chiama in causa l'azione del calore un po' elevato, è indispensabile far agire quest'ultimo prima dell'eventuale aggiunta di fenolo, che, lungo il riscaldamento, danneggerebbe troppo le proteine batteriche.

Poichè i sistemi qui descritti si applicano a tutti i vaccini batterici, diremo che, trattandosi di microrganismi assai vischiosi, epperciò aderenti all'agar (es. bacillo pestoso) può riuscire utile strisciare, in precedenza, sulla coltura, con grosse anse o triangolini di platino onde smuoverne i conglomerati microbici. Il più delle volte però basta accrescere la forza del getto per giungere allo scopo. Del resto l'esercizio offre al riguardo i criteri acconci a far mantenere, per ogni singola raccolta, un contegno omogeneo.

* * *

Viene ora il compito di radunare i liquidi bacteriferi in recipienti adatti per la loro elaborazione e conversione in vaccini. E qui comincia a farsi sentire il bisogno di fissare la potenzialità da darsi ai vaccini stessi. Se si vogliono preparati molto densi, occorre unire insieme le messi di molte colture: viceversa, per ottenere vaccini diluiti, deve limitarsi il quantitativo di materiale specifico. Ai diversi scopi si farà pertanto corrispondere la scelta dei recipienti più o meno capaci. La forma però che ci risulta vantaggiosa è quella di bottigliette Erlenmeyer provviste di pipio laterale (fig. 4 *B*). Al pipio si allaccia un tubetto di gomma lungo 5-6 cm., vi si aggiunge una provetta di custodia e si sterilizza all'autoclave. La bottiglia così è pronta per ricevere le patine eliminate dalle bocce di coltura. La manualità è delle più semplici e può compiersi con sicura garanzia asettica. Dai disegni della tavola illustrativa (fig. 4 si può agevolmente interpretare. All'estremo libero del tubetto di gomma, si infigge colle debite cautele il tubo della bottiglia colturifera *A* e, dopo una rapida agitazione per

tenere sospesa tutta la massa batterica nel liquido aggiunto, la si inclina in guisa da farla fluire nell'Erlenmeyer.

L'operazione si ripete per tante boccie di coltura, quante ne occorrono a raggiungere la massa calcolata, in rapporto al volume liquido, in cui deve mescolarsi e poi si provvede all'uccisione dei germi coi sistemi opportuni. Molti istituti raggiungono tuttodì lo scopo a mezzo del calore. E noi per molto tempo ci uniformammo a questa norma. Si uccidevano i germi a bagnomaria regolato alla temperatura minima incompatibile colla loro vita. Man mano, avendone riconosciuto il successo congiunto alla maggiore semplicità, ci siamo limitati — come sopra accennammo — al trattamento fenico, già proposto da Haffkine (1) e testè caldeggiato dal Lustig e dal Castellani (2). Il fenolo può incorporarsi nello stesso liquido d'irrigazione delle colture nel tasso 0,5 %: le masse culturali tenute per 24 ore a 37° in contatto con questo liquido disinfettante, si dimostrano, di regola, sterili. Occorre però che le emulsioni batteriche sieno omogenee, ossia prive di grumi, in cui potrebbero sopravvivere forme vitali in grazia degli strati protettivi. Ma ciò è agevole ottenere, assicurando ai becchi degli Erlenmeyer diaframmi di garza su cui si arresta ogni conglomerato. Per taluni vaccini, atteso lo speciale pericolo offerto dalla vitalità dei germi, può essere indispensabile il riscaldamento; così per esempio è del vaccino antipestoso. In tal caso si attende il ritorno della massa alla temperatura normale prima di fenicarla.

* * *

Comunque siasi raggiunta la sterilizzazione delle patine microbiche raccolte negli Erlenmeyer, viene presto il momento di diluirle per costituire il vaccino definitivo. A tal fine si terranno pronti grossi palloni di soluzione fisiologica sterile. Noi

(1) TAMAMCHEFF. *Experiences sur les Vaccins Phéniqués de Haffkine*. Ann. de l'Inst. Pasteur, T. VI, 1892.

(2) Sono in corso, nel nostro laboratorio, esperienze dirette a precisare quale metodo d'uccisione dei germi si concigli colla maggiore efficacia immunizzante del vaccino. Finora sembrerebbe che coll'etere si ottengano i migliori risultati.

adottiamo palloni della capacità di 5 litri all'incirca, contenenti 4 litri di soluto fisiologico (fig. 5 e 6). L'imboccatura di questi recipienti è munita di un tappo *T* a tre vie; per due di esse passano tubi di vetro *A* e *B*, che giungono fino al fondo del matraccio e portano all'estremo un cappuccio *c-c* di garza. La terza via è occupata da un tubo *D* che deborda appena dalla superficie inferiore del tappo di gomma. L'estremità esterna di quest'ultimo tubo si piega ad angolo retto, è chiusa con stuello d'ovatta e custodita da una provetta: gli altri due tubi, al disopra del tappo, si piegano a curva e col mezzo di gomme *g-g* immettono in pipette affilate *P-P* munite ognuna di due custodie, una interna e l'altra esterna (fig. 5-I): la custodia interna *i* è aperta all'estremità inferiore, quella esterna *e* consiste in una grossa provetta che include e governa il tutto fin quando si dovrà procedere all'infialettamento. I due tubi di gomma, di cui sopra, sono stretti da pinze a pressione *r-r*. La fig. 6 riproduce l'esempio di un pallone colla sua sostanziale armatura all'atto dell'infialettamento (3).

(3) Potrà essere utile sapere il ripiego a cui ricorrere quando mancano i tappi di gomma necessari per l'armatura dei palloni e dei palloncini. Trattandosi di oggetti oggi non sempre facili ad aversi, e ad ogni modo parecchio dispendiosi, il conoscere una risorsa succedanea può avere il suo interesse. Abbiamo da prima tentato comporre le armature con tappi di sughero: ma senza risultato, perchè essi non realizzano la perfetta tenuta. Abbiamo poi fatto ricorso al metodo del sifonaggio, allungando le branche esterne dei tubi efferenti del vaccino, in guisa da ottenerne la funzione di sifoni. Il sistema può servire, ma è lentissimo nel redimento ed assai ingombrante. Imparaffinando i tappi di ovatta, si ha per breve tempo qualche vantaggio, ma poi la paraffina si scrosta e non siamo riusciti più a produrre la voluta pressione nell'interno dei recipienti. Dopo vari tentativi, ho conchiuso che il miglior ripiego è di valersi del gesso da presa. Fatta la consueta armatura, come risulta dai disegni delle tavole, e limitandosi all'uso di cotone nell'otturamento delle bocche, si affonda il cotone stesso nel collo dei matracci fino ad ottenere uno spazio dell'altezza di parecchi centimetri: in tale spazio si versa la poltiglia del gesso da presa. Quando il gesso è ben indurito, costituisce un turacciolo a chiusura ermetica. In tale operazione può anche procedersi sotto la garanzia della sterilità. Compiuti i travasamenti, riesce poi anche facile scrostare il gesso dalla vetreria.

Molti di siffatti palloni sterilizzati all'autoclave, dopo raffreddamento, sono pronti a ricevere le masse batteriche destinate alla diluzione. Alla stregua della superficie coltivata, il materiale deve sempre calcolarsi in una leggera sovrabbondanza, poichè il titolo preciso dovrà poi ottenersi con una più esatta diluzione da effettuarsi in base al dosaggio, di cui ora parleremo.

L'introduzione della carica batterica nel matraccio avviene per il tubo *D*, (fig. 5). In esso, dopo tolta la custodia e stuello di ovatta, si infila, con le dovute cautele, il tubo di gomma dell'Erlenmeyer e se ne versa il contenuto. Agitando bene, si stabilisce una sospensione omogenea, dopo di che si procede al dosaggio per la rettificazione definitiva.

Questa di precisare la ricchezza del vaccino in elemento specifico per poi correggerla, come quasi sempre occorre, a norma del titolo prestabilito, è forse l'indagine più delicata ed anche più difficile fra quante si riferiscono alla preparazione dei vaccini batterici.

Diremo subito che le grossolane differenze fra partita e partita possono evitarsi procedendo con una stretta uniformità in tutte le operazioni ed in tutti i preparativi. Usando recipienti sempre uguali, un tipo d'agar sempre costante per quantità e per qualità, insemenzando sempre con le stesse dosi, livellando ancora bene le colture, evitando i divarî termici, ecc., può ottenersi una messe batterica omogenea, al punto che, agli effetti della superficie insemenzata, può istituirsi un calcolo abbastanza approssimativo del rendimento utile. La lunga pratica dimostra però che resta per solito un discreto margine di errori, a cui bisogna porre ripiego in altro modo; ciò perchè è assai difficile mantenere sempre la precisa uguaglianza di condizioni: piccoli scarti nella temperatura, nell'alcalinità, nell'aereazione, ecc., possono, malgrado ogni impegno, verificarsi, con immediato riverbero sullo sviluppo delle numerose colture. Quindi è necessario intervenire in secondo tempo e con mezzi speciali per correggere le conseguenze di fenomeni che sfuggono al dominio della disciplina tecnica.

Molteplici sono i metodi al riguardo escogitati, nè può essere mio proposito il passarli in rassegna critica. Solo devo

dire, che trattandosi di numerose e cospicue masse vaccinali, s'impongono sopratutto quei saggi che, anche a costo d'un qualche piccolo sacrifizio d'esattezza, assolvono il compito con molta rapidità. Gli è per questo che tutte le prove aventi ad es., per base il conteggio dei germi, se fatte in fretta non hanno valore positivo; se condotte con scrupolo, ripetendole fino ad ottenere numeri attendibili, importano tempo e pazienza enormi; quindi ritardi od arresti, il cui danno si fa sentire su tutta la produzione.

Queste prove rigorose hanno invece molta importanza nel campionamento dei sistemi più solleciti d'indagine.

Dopo aver sperimentato i vari metodi, ci siamo convinti che le *indagini torbidimetriche* meritano qui la preferenza. V'ha chi le effettua con saggi campionati, un sistema che ben condotto, in condizioni omogenee, permette di restringere gli errori entro limiti compatibili. Ma, per quanta cura si abbia, queste *scale campionate* mal si conservano, in causa di fenomeni d'autolisi, talvolta anche di auto-agglutinazione, sicchè, a meno di rinnovarle ogni giorno, cosa non molto semplice. l'osservazione non risponde bene. Inoltre, per i vaccini molto densi, il confronto scalare è assai arduo, anche per un occhio molto esercitato. Quindi occorrerebbe diluire, facendo i debiti calcoli sul mestruo aggiunto in più. Dopo molti tentativi, ho compreso l'utilità di riferirci allo spessore dello strato vaccinico occorrente per abolire un determinato fenomeno ottico. E' in fondo il concetto che presiede all'uso del lattoscopio di Donnet o dell'emometro di Bizzozero, salve le modifiche richieste dal caso speciale, avuto riguardo alla natura dell'emulsione di cui noi c'interessiamo.

Un primo provino che, uniformandosi a simile concetto, ha finora avuto successo nei nostri saggi è rappresentato dalla figura 7.

Si tratta di un cilindretto in vetro *C* largo 1 cm. e lungo 15, sul cui fondo piatto si osserva una leggera smerigliatura a croce. A circa due terzi della sua altezza, questo cilindro s'innesta con un imbuto *I* a rubinetto, la cui capacità corrisponde a quella del provino nella sua parte graduata. Dovendo procedere al dosaggio, si versa nell'imbuto il vaccino dopo averlo ben agitato e poi, aprendo con garbo il rubinetto, si fa

a poco a poco discendere il liquido fino a perdere la visione della croce.

La prova deve naturalmente farsi avvalendosi di tutti i mezzi che ne favoriscono la riuscita e l'attendibilità. All'uopo il vaccinoscopio s'innesta in una piccola camera oscura *O* che s'illumina con una lampadina elettrica *L* di 25 candele. Così si osserva sempre in condizioni identiche di luce riflessa ed i saggi dal punto di vista ottico possono rendersi comparabili. L'apparecchio si campiona con vaccini di titolo ben noto e per ogni titolo, ottenuto emulsionando quantità rigorosamente pesate alla bilancia di precisione, in esatti volumi di soluto fisiologico limpidissimo, si incide sul vetro una linea che segna il menisco dello strato occorso per far perdere di vista il segno convenzionale.

Nelle comuni esigenze il numero dei campionamenti è limitato, sia perchè sono pochi i vaccini in uso, sia perchè si va sempre più estendendo il sistema dei vaccini a titolo unico. A ciò deve anche aggiungersi un'altra particolarità favorevole: dalle nostre molteplici e minuziose indagini risulta che vaccini di concentrazione doppia o tripla, ecc., misurati nel provino esigono rispettivamente la metà, il terzo, ecc., di volume per produrre il voluto effetto ottico. Esiste insomma un rapporto inverso all'altezza del cilindro liquido. Può quindi con sufficiente esattezza anche affermarsi che il detto volume sta, *coeteris paribus*, in ragione inversa del quantitativo batterico sospeso, non essendovi altra causa di opacità del liquido, all'infuori di quella che ha rapporto coi microrganismi stessi. Mentre il fatto agevola da una parte l'uso dell'apparecchio, per i varî casi possibili in pratica, dall'altra contribuisce a dimostrarne la corrispondenza e la sensibilità. Le numerose prove istituite danno poi al riguardo la necessaria sicurezza.

A rendere omogenea la fornitura dei vaccini batterici, noi ci serviamo pertanto di tale vaccinoscopio che, indicando per differenza il volume di soluzione diluitrice occorrente per una parte aliquota del vaccino in esame, permette di stabilire in base ad un semplice calcolo il totale di soluto fisiologico da aggiungere ai singoli palloni, sempre quando, come già accennammo, il suo contenuto specifico sia in leggero eccesso. E'

appunto per questo che più sopra avvisammo alla necessità di mantenersi in giusti limiti nell'aggiunta di liquido fisiologico per il distacco delle colture. Il modo di operare è molto semplice. Agitato bene il pallone, si produce nel suo interno, a mezzo di una pera di gomma *M* applicata al tubo *D* (fig. 5 e 6) coll'intermezzo di garanzia filtrante, la pressione utile per spillare da uno degli altri due tubi a pipetta, una certa quantità di emulsione. Ricevuta questa nell'imbuto del vaccinoscopio, ve la si lascia poi fluire grado grado, fino al punto preciso in cui scompare la visione della croce a smeriglio. Siccome abbiamo premesso (e ci siamo impegnati a mantenere) una densità superiore alla norma, così il livello dello strato occorrente per raggiungere lo scopo sarà più basso di quello stabilito nel campionamento dell'apparecchio. Si legge pertanto la differenza precisa fra le due linee e si calcola senz'altro il volume utile per ottenere il titolo voluto.

Supponendo, ad esempio, che il pelo dello strato non corretto coincida con la divisione segnante il volume di cmc. 12,8, mentre il segno del volume campionato corrisponda a cmc. 15, la quantità di liquido da aggiungersi sarà di 15-12,8=2,2; infatti risulta sospeso in cmc. 12,8 ciò che dovrebbe esserlo in 15. Sicchè, se l'intiera massa fosse di cmc. 3800, ne seguirebbe l'equazione: $12,8 : 2,2 = 3800 : x;\ x = 653,1$. La quantità di soluzione fisiologica da addizionarsi sarebbe dunque di cmc. 653,1. Colla stessa tecnica, già descritta per introdurre le raccolte batteriche, si provvederà all'aggiunta del liquido calcolato, non dimenticando il fenolo, che, in complesso, deve rispondere al tasso del 0,5%. In tutte queste ed altre analoghe aggiunte, per cui richiedesi il rigore dell'asepsi, consiglio il dispositivo rappresentato dalla figura 5.

Quando sono in causa vaccini misti, è necessario stabilire il titolo per ogni componente, poichè il vaccinoscopio da me proposto non misura se non l'opacità complessiva generica ottenuta con qualunque vaccino o con qualunque sostanza insolubile. Ulteriori indagini diranno, se dovrà tenersi calcolo di qualche costante ottica o se occorrano più rigorose rettifiche in rapporto alle masse diluitrici. Per ora posso già affermare che, così procedendo, si ottengono risultati molto soddisfacenti.

Prima che infierisse l'attuale guerra, avevo fatto ricorso ad una casa estera, per ottenere un tipo di vaccinoscopio più perfezionato, più maneggevole ed anche più spiccio nei suoi responsi: e su mia indicazione lo scopo era di già raggiunto; se nonchè, resi difficili e poi subito impossibili taluni scambi internazionali in causa della conflagrazione europea, l'apparecchio restò alla casa costruttrice. Spero ad ogni modo poter dire quanto prima che l'industria italiana, sotto lo stimolo della necessità e dell'amor proprio, abbia vinto ostacoli, che prima si dicevano sormontabili soltanto dalle case tedesche. Si tratta di un provino che dovrebbe rispondere alle varie esigenze della pratica, per essere di più facile maneggio, e capace di indicazioni più precise, per quanto può pretendersi da un tal genere di strumenti. Esso ha, nel complesso, la forma di una grossa siringa Luer, salvo i dettagli che lo rendono idoneo allo scopo a cui si mira.

Così il cilindro esterno, invece di finire a punta per adattarsi all'agocanula, è a fondo cieco ed appiattito, con vetro trasparente. Dicasi lo stesso del cilindro interno, il cui fondo si adagia esattamente sull'omologo del cilindro esterno. Quest'ultimo, alla parte superiore, in prossimità del bordo che delimitata il fondo, porta un imbuto comunicante coll'interno. Questo imbuto, munito di rubinetto, ha lo scopo di ricevere i liquidi su cui cadono le osservazioni. Questi liquidi penetrano nell'interno, aspirando a mezzo del cilindro centrale che fa da stantuffo. Un'armatura, che si accolla all'estremo chiuso dell'apparecchio, porta dei dischi coi segni indici di diversa forza, secondo la densità dei vaccini in esame. Per vaccini molto leggeri servono indici poco apprezzabili, per quelli densi occorrono segni molto marcati.

Scelto il disco adatto, come la pratica può consigliare, s'infila nella guida dell'armatura e poi, con lento moto a spirale impresso al cilindro-stantuffo, si aspira dolcemente il liquido dall'imbuto, fino a veder scomparire la visione del segno sul disco indice: ottenuto l'intento, si torna a spingere il liquido nell'imbuto con moto contrario dello stantuffo, fino alla ricomparsa del segno.

L'apparecchio che presenterò all'Accademia non appena ne sarò in possesso, avrebbe il vantaggio di potere, con alter-

native di aspirazione e di pressione, precisare meglio i valori limiti in rapporto al fenomeno ottico, di cui c'nteressiamo. il provino agisce in senso orizzontale, a differenza dell'altro sopradescritto; come questo però deve collocarsi in una piccola camera illuminabile con luce elettrica costante in forza: esso ha pure due graduazioni, di cui una esprime il volume e l'altra il peso batterico in rapporto al volume.

* * *

Corretta la diluzione in base alla lettura del vaccinoscopio, si sarà ottenuta la massa vaccinica da distribuirsi nelle fiale.

Anche l'infialettamento è operazione molto delicata, a cui deve adibirsi un personale ben istruito. Riportandoci alla fig. 6, basta accrescere in misura opportuna la pressione nel matraccio, a mezzo della pera di gomma *M*, perchè, aprendo la pinza *r*, il liquido si spinga con forza nel tubo e quindi nell'annessa pipettina; nell'apice di quest'ultima, protetta da custodia, s'infila il collo della fiala e così il vaccino fluisce rapido in guisa da poter condurre l'operazione con sollecitudine. Due abili infialettatori riescono a distribuire quattro litri di vaccino in meno di mezz'ora. Le fiale vengono saldate alla lampada mano mano che si riempiono. Ogni pallone essendo numerato, segue corrispondentemente la divisione delle fiale in serie: il nulla osta per l'utilizzazione di ogni singola serie si dà in base all'esito del relativo controllo.

* * *

Il controllo dei vaccini batterici può aver di mira l'efficacia specifica e la purezza. Il giudizio della genuinità del vaccino dovrebbe a rigore dedursi dal buon esito di entrambe le ricerche. Le prove d'efficacia, a parte il saggio vaccinoscopico già descritto, effettuabile finchè il vaccino è libero da fenomeni di lisi, richiedono però un tempo assai lungo ed importerebbero un enorme ritardo nell'uso del prodotto. Perciò, di solito, si fanno una volta tanto sul tipo di vaccino che s'intende preparare: avutane conferma favorevole con prove sugli animali ed applicazioni giustificate nell'uomo, si provvede a mantenere le condizioni efficienti, per conservarne il tipo. Queste condizioni si realizzano rinnovando spesso gli stipiti con isola-

menti dai casi occorsi là dove preme ottenere la garanzia vaccinale, con passaggi di serie in animali sensibili, con l'impiego simultaneo di stipiti diversi anzichè di uno solo, ecc. D'altra parte si procede a giornalieri trapianti del germe stesso, onde impedirne l'invecchiamento. Per tal modo, se tutte le operazioni sono condotte a dovere, non possono più temersi anormalità nel carattere del vaccino.

Indispensabile invece è il ripetere, per ogni partita, le prove di purezza. Esse vengono a risolversi, per massima, in indagini di sterilità e si fanno con semine in agar a piatto ed in brodo, le une e le altre aerobiche ed anaerobiche.

Numerose colture con materiale preso tanto dai palloni lungo l'infialettamento, quanto dalle fiale già riempite, devono essere concordi nel dimostrare che il vaccino è sterile. Ciò si apprende, per norma, dopo quattro giorni di sosta in termostato a 37°. Non è consigliabile restringere l'osservazione ad un periodo più breve, non solo per riguardo agli sporigeni, che talora abbisognano di una lunga incubazione per dar tempo alle spore di germogliare, ma anche per riguardo alla presenza dell'acido fenico: questo antisettico, rimasto lungo tempo a contatto coi microrganismi eventualmente vivi, ne ritarda di molto lo sviluppo. Superfluo dire che se, al controllo, anche una coltura sola rivelasse una crescita microorganica, l'intiera partita che vi corrisponde è da dichiararsi sospetta epperciò deve sacrificarsi.

Dall'esperienza lunghissima si è visto, che, procedendo coi rigori sovradescritti, simile sacrificio è un'eccezione estrema. E così abbiamo concluso per l'opportunità di non interrompere alcuna operazione in attesa del responso dei vari saggi, come in principio si era disposto; ciò era causa di grave lentezza esecutiva, poichè, ad ogni pallone, dovevano attendersi quattro giorni prima e quattro giorni dopo il suo infialettamento per poter dare il *nulla osta*.

Noi completiamo il saggio di purezza con una ricerca più generica del *ne noceat*: essa viene d'ordinario eseguita sulle cavie del peso di circa 300 gr. Nel loro peritoneo s'inocula 1 cmc. del liquido preso da ogni partita in esame. Un

tale innesto per i vaccini ben fatti e scevri di sostanze estranee non deve produrre la morte.

A questo punto viene ovvia la domanda, se, avendo ottemperato a tutte le norme ora esposte, possiamo con sicurezza garantire che l'intiera massa veccinica sia sterile. In altre parole si affaccia il quesito, se, essendosi, con esito favorevole, compiuto l'esame su pochi cmc. di vaccino, questo esito possa applicarsi a tutto il volume che il matraccio contiene (4 litri e più nel caso nostro). La risposta è naturalmente negativa, perchè, se la parte aliquota risponde del carattere della massa quando trattasi di materie disciolte, non risponde più quando invece si ha da fare con materie sospese, com'è il caso di germi inquinanti che possono essere raccolti solo in certi punti circoscritti della massa. E' chiaro che laddove l'inquinazione si riduca soltanto a pochi germi, giusta una probabilità molto comune, l'imbattersi in essi nell'eseguire i prelievi pel controllo è cosa del tutto fortuita. Non avvenendo ciò, il controllo riesce favorevole e noi dichiariamo pura l'intiera partita, mentre in realtà non la è. Viceversa i pochi microrganismi che inquinassero la partita potrebbero trovarsi unicamente in qualcuna delle poche fiale scelte per le ricerche di collaudo; il controllo riesce sfavorevole e noi decretiamo il sacrificio di una raccolta, che, se vogliamo, può esser stata liberata dalla parte difettosa nella stessa operazione di scelta dei campioni. Dicasi altrettanto dei casi in cui l'inquinamento si limita a qualche fiala difettosa e di quelli pure degni di considerazione, in cui può pentrare traccia di pulviscolo all'atto della presa del materiale di semina, o pel vuoto relativo prodottosi nell'interno delle fiale, o per errori possibili anche nelle ricerche più accurate. Questa tesi io ho già discusso a fondo in altre memorie (4) a cui rimando per una congrua illustrazione dei lati difettosi che ha il sistema ancor oggi seguìto dai più nello stabilire la salvaguardia dalle impurezze microbiche in fatto di materiali d'uso ipodermico. Risulta da quei rilievi che un criterio più sicuro al riguardo,

(4) Studi sulle bioreazioni dell'arsenico, tellurio e selenio, ecc. Roma, Tip. delle Mantellate, 1907.

è quello della così detta ***sterilità visibile*** a mezzo di indicatori della vita batterica: questi indicatori — fino ad oggi il più attendibile secondo le mie ricerche e le mie proposte è il tellurico potassio — aggiunti in minima quantità (1:5000 — 1:100000) alle masse vacciniche, prima d'infialettarle, funzionano accusando l'inquinamento solo nelle fiale che contengono microbi suscettibili di sviluppo. Il fenomeno è chiaramente apprezzabile per la tinta nera che assumono i depositi microbici infiltrati dal tellurio elementare.

Un'estesa e vantaggiosa applicazione del sistema venne già fatta al tempo della nostra guerra libica. Allora l'istituto sieroterapico milanese, per ordine del Ministero della guerra, seguendo il mio metodo, preparò il vaccino antitifico destinato alle truppe di Libia col rivelatore al tellurito e la corrispondenza pratica fu ottima, poichè si rese possibile il distinguere a prima vista le fiale utilizzabili dalle inquinate, che si presentavano annerite. Certo il metodo presume camere di lavoro ideali ed impianti ideali, come ideale dovrebbe pur essere la condotta tecnica di tutti coloro che attendono ad un così delicato servizio, dai più alti fino ai più umili sottoposti. Gli è perciò che, specialmente quando si tratta di enormi produzioni, si continua sempre col metodo antico, in cui, sebbene spesso a torto, si conta sulla pretesa garanzia dell'acido fenico o di altro antisettico, che dovrebbe far giustizia di ogni germe da cui i prodotti, per malavventura venissero a compenetrarsi. E noi pure, fino ad oggi, come sopra è descritto. abbiamo seguìto la stessa via, cercando nella maggior possibile accuratezza e negli scrupoli dell'arte il voluto riparo contro le varie incognite. Ed i fatti dimostrano che anche questa via ben seguìta conduce al successo. Quando però si trattasse di organizzare una vasta preparazione permanente ed all'uopo si disponesse di locali *ad hoc*, provvisti di arredo e corredo scelti, oltre la mano d'opera ben istruita secondo le più moderne esigenze scientifiche, sarebbe assai vantaggioso, da vari punti di vista, l'affidarsi ad un buon indicatore della vita batterica, per effettuare lo scarto delle fiale che avessero ad inquinarsi lungo le numerose manualità, a cui si assoggettano.

Naturalmente al sistema devono poi farsi corrispondere tutti i dispositivi che lo rendono attendibile coll'assicurarne la funzione. Così devono escludersi gli antisettici, devono adottarsi tutte le norme più opportune per favorire lo sviluppo microbico là dove è necessario depistare l'inquinamento e conciliarsi il tutto colle varie esigenze, a cui deve impostarsi il carattere del vaccino. Si tratta in somma di promuovere il più possibile un'autodenuncia dei germi estranei.

Fra i vantaggi della *sterilità visibile* può poi anche esservi quello del non esser costretti a rigettare un'intiera partita di fiale quando solo una o due risultino inquinate e d'altro canto, come sopra ho già detto, seguendo le buone regole dell'asepsi, proprio questo può succedere, che traccie di pulviscolo, penetrando nelle masse liquide, ne infiltrino punti circoscritti: orbene questi punti, mercè il meccanismo biologico dell'indicatore, vengono a denunciarsi e quindi a sequestrarsi in quelle uniche fiale, dove per caso i pochi germi sono capitati.

Un ultimo profitto derivante dall'applicazione dei metodi della sterilità visibile, metodi, in cui è implicita l'esclusione degli antisettici, si è quello di omettere nelle emulsioni l'aggiunta di tutte le sostanze che fanno degenerare le cellule batteriche col loro prolungato contatto. Molti invero fanno colpa all'acido fenico, all'etere, al tuololo, ecc., di sminuire l'efficacia dei vaccini. Escludendo consimili materiali, la conservazione dei vaccini riesce più facile, più sicura e di maggior durata.

Pertanto, pur non rinunciando al controllo coi metodi oggi in uso, per riconoscere la purezza dei vaccini batterici, gioverà sempre accompagnarla colla garanzia dei rivelatori biologici nel senso sopradescritto.

Frattanto, ritraendo criterio dalla nostra lunga pratica, ritengo opportuno un breve cenno sulle circostanze, in cui con maggiore facilità si verificano gli inquinamenti, onde ammonire in rapporto alla relativa profilassi.

1° Le troppo grandi masse di soluzione fisiologica corrono rischio di non essere bene sterilizzate, perchè il calorico delle sterilizzatrici, a meno di ricorrere a ripieghi di eccezione,

non investe colla dovuta garanzia le loro parti centrali: quindi si consiglia non impiegare volumi superiori ai 4-5 litri.

2° Le aperture troppo ampie rappresentano per tutti i recipienti, ma in modo specialissimo per quelli di coltura, punti molto vulnerabili, essendo esposti, nelle manovre di semina e di raccolta, all'ingresso di pulviscolo favorito dai facili squilibri di pressione. E' pertanto utile restringere ogni larga bocca a mezzo di un batuffolo di ovatta traversato da un piccolo tubo a servizio delle semine. Vedere il dispositivo nella figura 2, tav. I.

3° I tappi bagnati, sovrattutto quelli imbevuti di liquidi nutritizii, divengono facili terreni culturali di germi volgari: nel maneggio consecutivo di simili tappi è poi facile, che qualche goccia inquinante penetri nei recipienti, trascinandovi milioni e milioni di microrganismi. Le migliori provvidenze al riguardo consistono nei metodi corretti di sterilizzazione e nel maneggio razionale delle bottiglie di sviluppo.

4° Può talora occorrere che i germi stessi, onde il vaccino è costituito, siano in parte ancora vivi per manchevole contatto col disinfettante od imperfetta azione del calore. Questo danno è però di solito rimediabile in secondo tempo.

5° Imperfetta ed impropria chiusura delle fiale per cui queste sono o divengono beanti con facile penetrazione di pulviscolo in virtù della pressione negativa che sussegue al riscaldamento necessario per fondere il vetro. L'arte di ben saldare le fiale si apprende con un po' di studio e di esercizio pratico. Ma poi, una per una, le fiale devono passarsi in rassegna scrupolosa onde assicurarsi della loro integrità.

6° Di tutte le forme d'inquinamento, a prescindere dal caso, in cui permangono in vita i germi specifici costitutivi del vaccino, la più pericolosa è quella data dalla penetrazione di pulviscolo, o di materiale batterifero estraneo, nelle boccie di coltura: e ciò per lo sviluppo enorme che ne consegue. A consimili evenienze si mette riparo, procedendo alle colture con ogni circospezione e, se, malgrado tutto, non si riesce talvolta a scongiurare il fatto, un esame rigoroso di ogni singola cultura permetterà di escludere quelle che risultassero sospette.

7° Finalmente, da un punto di vista più generico, devesi dire che l'asepsi viene a facilitarsi col mettere in pratica tutte le regole di pulizia del corpo, specie delle mani, colla proprietà e quindi frequente bucato delle vestaglie e col contegno corretto di quanti attendono alle diverse operazioni di laboratorio. Aggiungansi tutte le buone norme d'igiene degli ambienti, sopratutto degli impiantiti e delle superficie, da cui può sollevarsi pulviscolo, e che devono mantenersi in quel grado di umidità opportuno per una garanzia profilattica.

Aggiungerò ancora, a titolo di esemplare schiarimento, che la maggior parte delle inquinazioni verificatesi nella nostra produzione vaccinale coincidettero con lavori murari, da cui non si poteva prescindere.

Come corollario sintetico di questi ultimi criteri è da porsi in evidenza l'utilità sempre più sentita di sostituire l'asepsi all'antisepsi, con tutti i rigori di indirizzo e di metodi adottati, ad esempio, dalla moderna chirurgia.

* * *

Seguendo le norme ora descritte ed attenendoci alle cure che ho passato in rassegna, noi siamo pervenuti alla preparazione di milioni e milioni di dosi con successo giustificabile in base all'assenza di qualsiasi fenomeno estraneo all'effetto specifico voluto, alle tipiche reazioni, in rapporto alla carica batterica inoculata ed infine anche alla difesa immunitaria conseguita. Questa difesa che in sostanza costituisce lo scopo ultimo, a cui mira il vaccino, oggi non può rilevarsi che ad episodi: inoltre è prematuro il conchiudere in merito, per la difficoltà di raccogliere dati numerosi ed omogenei che permettano pronunciamenti propri della *ragion veduta*. Questo dico, perchè, nella somma urgenza di provvedere e colla pressione di altri gravi interessi non sempre conciliabili con quelli sanitari, le vaccinazioni andarono incontro a molte lacune e disappunti che ne sminuirono l'efficacia. Si aggiunga ancora la difficoltà di una misura attendibile del successo, perchè non sempre esistono gruppi idonei per un controllo risolutivo. Nè può bastare l'affidarsi alle pure indagini di laboratorio, es-

sendovi ancora incertezza sull'importanza dei dati sperimentali in rapporto alla designazione del tenore immunitario.

Basti dire a questo proposito, che il potere agglutinante del siero sanguigno, nei vaccinati, per citare uno dei criteri a cui più spesso il tecnico si appella, risulta assai più alto e più duraturo che non nei guariti dall'infezione naturale, a cui si attribuisce il massimo della garanzia immunitaria.

Tutto ciò potè far sì che, in singole inchieste, il frutto pratico è rimasto nascosto o financo mentito da altri fatti accessori. So che taluno ha già raccolto e si stanno da altri raccogliendo elementi sicuri di giudizio; e quando questi esprimano la realtà di molti e larghi campi di osservazione, col lume di una critica serena, potremo conchiudere con certezza obbiettiva.

Ma anche ora, per quanto è consentito in base a rilievi temporanei non privi di importanza per il conforto di controprove, può già affermarsi che sia la mortalità come la morbosità, dal punto di vista quantitativo e, la seconda, anche qualitativo, vennero decisamente influenzate dalla vaccinazione. Ed è poi anche da osservarsi essere questi i primi anni che la pratica si introduce da noi su vasta scala, e, come tutte le innovazioni, massime quelle che si accompagnano con disturbi anche minimi a carico di chi sta bene, sono accolte con generale ripugnanza. Occorre quindi preparare il terreno, togliere i facili allarmi, combattere le diffidenze ed i superstiziosi istinti.

In tutta questa opera di propaganda e di *profilassi morale* fu giuocoforza transigere alquanto col rigore del metodo: e qui è senza dubbio uno fra i motivi del suo incompleto rendimento pratico. Anche per quanto si riferisce alla *dose vaccinica* è provato, che è indispensabile non mantenersi inferiori ad un certo limite nello stimolo reattivo epperciò nella carica batterica, da cui lo stimolo deve prodursi. Le dosi di 2-3 miliardi di germi già proposte dai vaccinatori tedeschi sono — almeno per il tifo e come dosi unitarie — senza dubbio esagerate e gli stessi proponenti dovettero mitigarle, onde evitare le troppo intense reazioni: ma il discendere sotto i 300 milioni anche per il primo innesto e non disporre per un complessivo

di almeno due miliardi di bacilli inoculati fra tutte le iniezioni — parlo sempre del vaccino antitifico — se da un lato può soddisfare in rapporto ai pochi disturbi degli inoculandi, non può dall'altro essere consigliabile, allorquando preme raggiungere una sicura garanzia immunitaria.

I nostri attuali vaccini preparati con colture di tifo e di paratifo *B* sono oggi sulla base di 800 milioni di germi del primo e 400 milioni del secondo microrganismo per centimetro cubo. Si consiglia di iniettare un mezzo cmc. pel primo innesto, 1 pel secondo e 1,5-2 per il terzo, a seconda dei fenomeni reattivi notati nei vari individui. Sicchè risulterebbe in complesso una totalità di germi variabile fra 3 e 4 miliardi nei tre innesti.

Il vaccino contro il colera contiene un miliardo di bacilli per cmc. e se ne inoculano tre in due vaccinazioni. In vista della grande tolleranza è generale il convincimento delle autorità sanitarie militari, che si possano raddoppiare i quantitativi batterici, salendo così a due miliardi di vibrioni per cmc.

A queste misure, relativamente elevate, si è per altro giunti con metodo progressivo, premendo costituire un po' di piedestallo morale alla nuova provvidenza sanitaria, per salvarla dalle aggressioni istintive dei misoneisti e darle tempo a dimostrare i vantaggi che si conseguono a prezzo di minimi disturbi. Diremo anzi, che vi furono periodi in cui, non volendo compromettere gravi interessi bellici, l'Autorità militare si vide costretta a ridurre di molto le dosi di vaccino date come classiche. Nè può dirsi esclusa la probabilità che a simili atti di prudenza si debba ricorrere ancora per l'avvenire (5).

Di fronte alle misure sanitarie che importano disturbi alla salute dell'individuo, l'esercito si trova in circostanze specialissime. Basti, per tutti citare l'esempio della profilassi antimalarica a mezzo del chinino, una pratica per la quale, nel caso della truppa, c'è chi ha stabilito il dilemma: o rinun-

(5) Ad una riduzione inevitabile di dosi porterebbe già per sè stesso il provvedimento, da taluni invocato, d'introdurre i vaccini per la via endovenosa in vista della maggiore sensibilità e della maggiore imponenza dei fenomeni reattivi.

ciarvi, o ridurre le dosi almeno alla metà di quelle consigliate. Eppure il chinino produce soltanto fenomeni transitori di ronzio agli orecchi, iperestesia, debolezza agli arti inferiori.

Siccome però, con lo sminuire le dosi, viene anche a sminuirsi il profitto protettivo, è da augurarsi, sempre che sia possibile, si escogitino mezzi idonei per conciliare i due interessi, militare e sanitario, tanto più che di regola il secondo è del primo parte vitalissima. Inoltre non sono a dimenticarsi le necessità delle rivaccinazioni.

Se ora si considera in sintesi l'indirizzo tecnico testè descritto, resta facile convincersi che, a cominciare dall'istante in cui si insemenza il microrganismo onde il vaccino ripete il suo valore specifico, fino a quello in cui il vaccino si inocula, tutte le operazioni si effettuano al coperto del pulviscolo atmosferico, sia che l'aria si filtri, sia che le diverse manualità si compiano con garanzia da quegli ovvii esquilibri atmosferici, che sono facili cause di inquinamento dall'esterno, sia ancora che si adottino quei congrui mezzi protettivi, di cui più sopra abbiamo fatto parola.

Assicurata così una delle condizioni essenziali per il buon uso dei vaccini batterici, quella della sterilità, rimane l'altro interesse della pratica efficacia conciliata colla tolleranza degli inoculandi. Noi abbiamo già fatto cenno sui criteri oggi posseduti. Gli ultimi vaccini, malgrado il tasso piuttosto notevole di antigeni, si annunziano sempre accolti senza contrasti. D'altra parte il larghissimo loro impiego, fino a potersi già contare milioni di vaccinati, permetterà di raccogliere un abbondante frutto statistico ed attendibile.

E, se ulteriori consigli per nuovi perfezionamenti seguiranno, ad essi volentieri siamo pronti ad uniformarci.

TAVOLE ILLUSTRATIVE.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

FIG. 1. — Boccia per cultura in agar. — *A*, punto di semina; si arma come spiega in dettaglio la fig. 2. — *B*, punto d'irrigazione. — *C*, tubo per il recupero delle emulsioni batteriche (vedi fig. 4.). — *S S*, solco circolare, che, accumulando l'agar, costituisce, dopo la solidificazione di questo, una cravatta che mantiene fissa la patina lungo le varie manovre.

FIG. 2. — *B*, tubetto per introdurre la semenza batterica; l'operazione si fa per l'estremo del tubo stesso, dopo tolti la custodia *C*, e lo stuello *t'*. — *A*, collo della boccia di coltura spiegato in 1, munito del suo tappo d'ovatta *t*.

FIG. 3. — Sistema per l'insemenzamento. — ***P***, pallone con brodo, in cui si sono emulsionate le necessarie patine dei batteri costituenti la semenza. Tolta la custodia *C*, del tubo *T*, si innesta all'apice di quest'ultimo l'estremo *m*, dell'insufflatore di gomma *M*. — L'aria insufflata si debatterizza attraverso l'ovatta del tubo ***T***, ed accresce la pressione nell'interno di ***P***. Aprendo allora la pinza *K*, il liquido esce con forza per la pipetta ***L***, il cui estremo *n* si immette nell'apertura corrispondente della boccia di coltivazione; *r* è una custodia del tubo *L;* *r'* è una campana di garanzia, che, coprendo col suo estremo inferiore il collo della boccia di coltivazione, lo tutela dall'ingresso di pulviscolo.

FIG. 4. — Raccolta delle masse batteriche sviluppate. Per *B*, è avvenuta l'irrigazione forzata, in guisa da staccare la patina microbica: agitando e sollevando *A*, l'emulsione fluisce in *B*, pel tubo di gomma *C*.
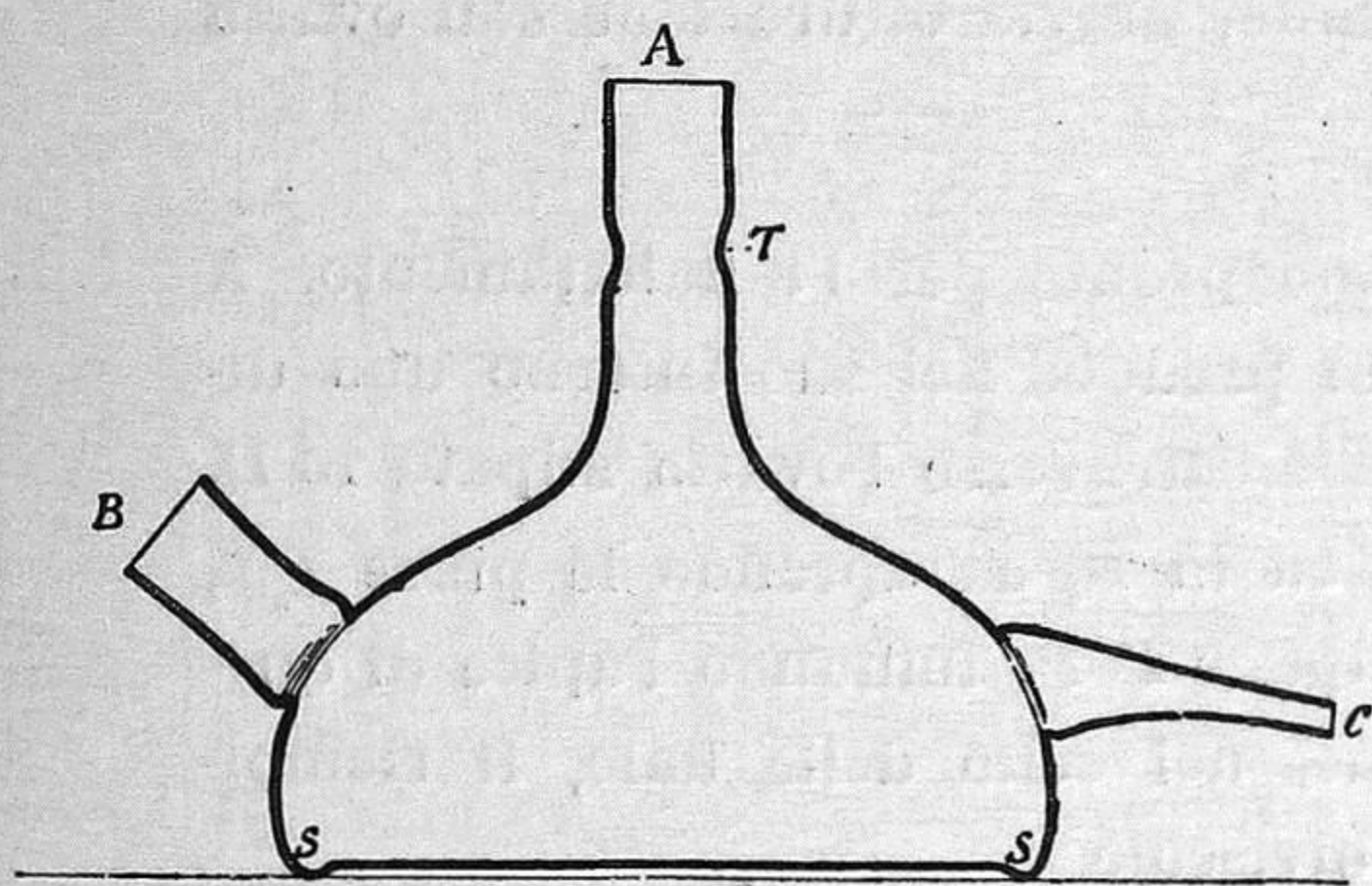
Fig. 1.
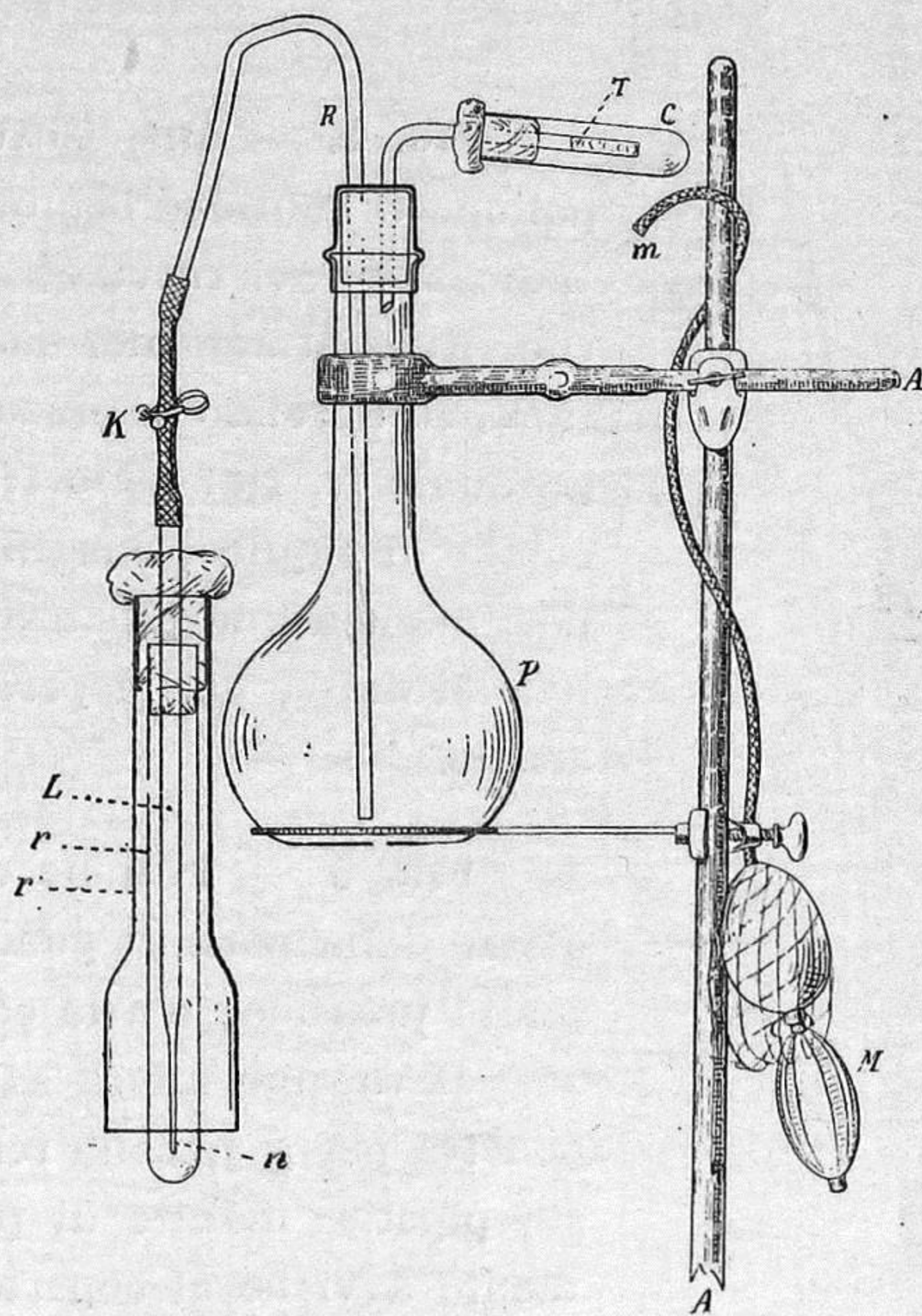
Fig. 3.
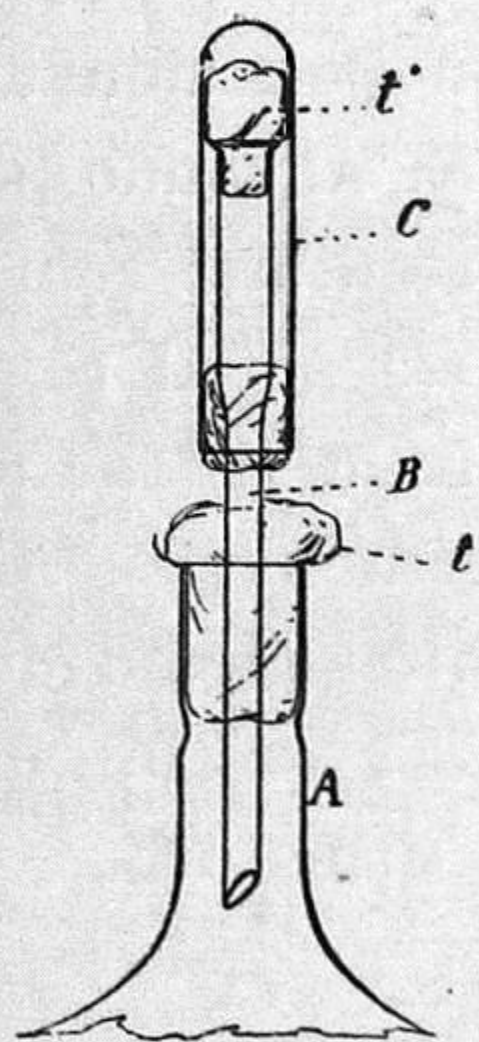
Fig. 2.
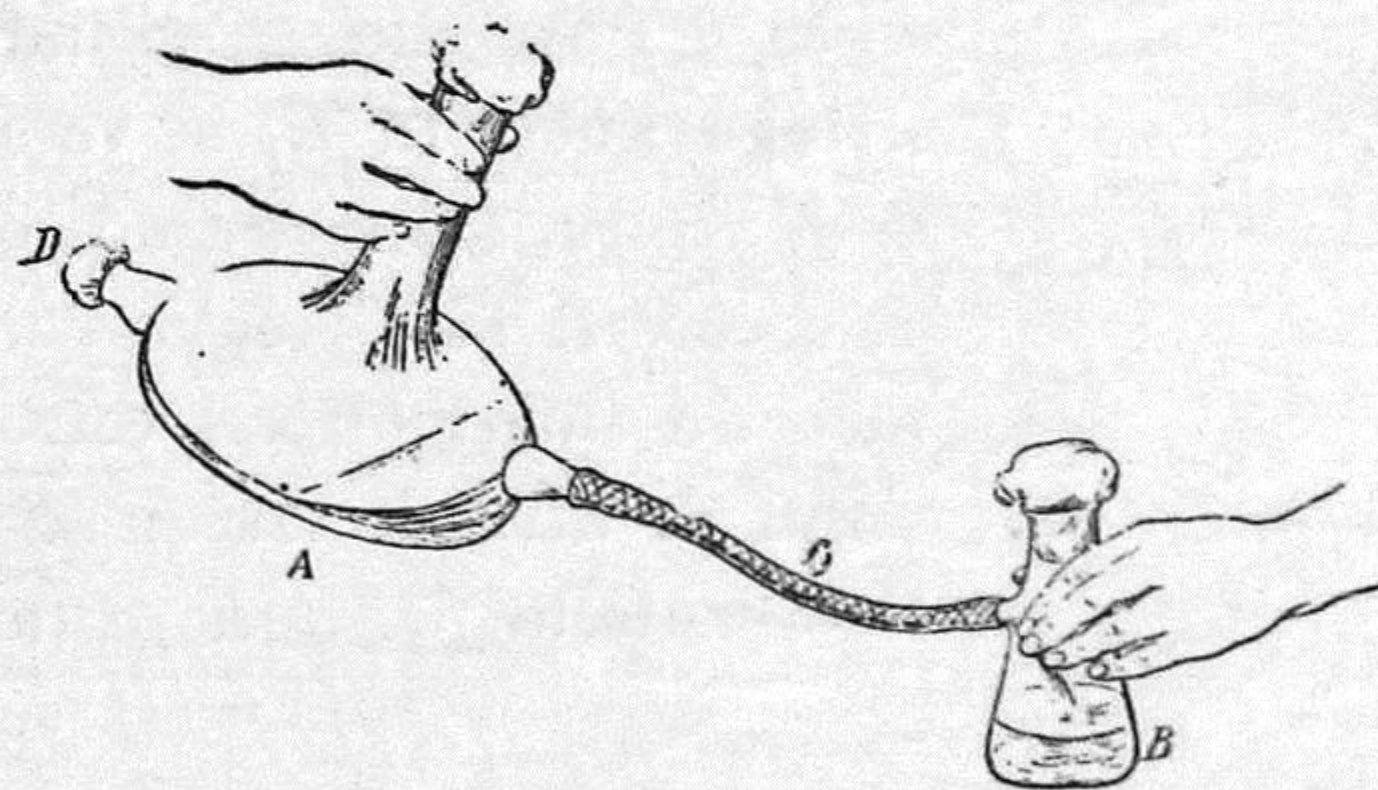
Fig. 4.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

FIG. 5. — Dispositivo per rettificare il titolo dei vaccini. Il pallone *O* contiene l'emulsione da diluirsi al limite designato dalle indicazioni del vaccinoscopio. *H*, pallone con liquido fisiologico sterile. Aumentando nel suo interno la pressione a mezzo della palla *M*, ed aprendo la pinza *K*, il liquido sale e per *S* passa nel cilindro graduato *N*. Dal detto cilindro si spinge poi in *O* la quantità calcolata di liquido, insufflando aria filtrata per *S'* ed aprendo opportunamente la pinza *K'*. Al tubo che porta detto liquido nel pallone si unisce poi la pera di gomma, previa otturazione con ovatta sterile.

FIG. 6. — Pallone di vaccino pronto per l'infialettamento. A mezzo della pera di gomma *M* si produce nel suo interno una discreta pressione d'aria che si filtra attraverso l'ovatta stipata in *D*.

Il vaccino allora sale in *A* ed in *B*, ed aprendo le pinze *r r*, penetra per *g g*, nelle relative pipette *P P*; infilando l'apice di queste pipette, munite di protezione, nel collo delle fiale, il riempimento avviene al coperto del pulviscolo.

FIG. 7. — Modello di Vaccinoscopio. Il cilindro *C*, alto e stretto, porta sul suo fondo una croce a smeriglio *D*. Nell'imbuto *I*, si versa il vaccino da rettificare, che, aprendo con cautela il rubinetto, fluisce in *C*. Se ne lascia scorrere tanto da perdere la visione della croce *D*. Giunti a questo punto, si legge sulla scala graduata il volume occorso e si procede alla correzione giusta quanto indica il testo. L'osservazione si fa col sussidio della camera oscura *O* illuminata dalla lampada elettrica *L*, che assicura sempre la stessa intensità luminosa.

FIG. 8. — Saggio d'un vaccinoscopio più perfezionato. *A*, cilindro di vetro cavo che s'innesta all'imbuto *K*. Al fondo porta una croce a smeriglio. *B*, cilindro che funge da stantuffo come in una siringa Luer. In *K*, si versa il vaccino; aperto poi il rubinetto *r*, lo si aspira, manovrando con *B*, fino a perdere la visione del segno di croce. Il resto segue come per l'altro vaccinoscopio. Alla croce incisa a smeriglio sul vetro, potranno sostituirsi alcuni dischi con segni di diversa forza, secondo la densità dei vaccini in esame. Cotali dischi potranno collocarsi in apposita armatura.

Fig. 5.

Fig. 6.

Fig. 7.

Fig. 8.